頂梢微體嫁接法技術改進及應用

Improved Technique of Shoot-tip Grafting for Obtaining Citrus Foundation Stocks Free of Viruses and Likubin Organism

蘇 鴻 基*

Su Hong-Ji

摘 要：本省各種柑橘品種母樹普遍感染立枯病(黃龍病、Likubin)、萎縮病 (Citrus tristeza virus) 、破葉病 (Tatter leaf virus) 及鱗砧病 (Exocortis viroid) 等系統性似毒素病或毒素病 ，而一般供繁殖用接穗均帶有一種以上之病毒，以致於柑苗之生長與結果頗受影響。Murashige 等 (1972) 開發之倒T型頂梢嫁接 (Shoot-tip grafting) 技術廣用於柑橘原種之無毒化，但其成功率低而費時。經本試驗所得下例修改法，其成功率從低於 20 %可提高達 60 %以上，並可加速所得無毒芽之增殖效率 。 將試管中培養 4 ～20 天砧木實生苗枳橙切頂，距切端 2 ～ 3 公厘處切 0.3～0.4公厘口徑之直角三角形，挖除皮層成小穴，另用皮層做與穴同大之覆蓋，在無菌箱內操作，將消毒過之柑橘原種幼芽生長點 (0.2公厘) 切取，切面向下放入穴中，然後加蓋。嫁接幼苗放於含液體培養試管中，經二天暗處理後，用紗布包蓋移於溫室培養，二週後除紗蓋，培養 2 ～ 3 週後生長點長出幼芽，就可取出，供為幼苗接穗 (1 ～1.5 公分長) ，使用臘膜 (Parafilm) 包被，以旁接法 (Side graft) 嫁接到缽植粗皮檸檬實生苗 (20～30 公分) 之上方幼莖上。在溫室中培養 3 個月左右，長出幼芽後，其腋芽，可供芽接增殖每 3 ～ 4 個月可重覆一次芽接增殖。在一年間從一生長點，可期獲得 500個左右之無毒芽。此改進法併用熱療法，更可增加無毒化效果。

關鍵字：頂梢嫁接、無毒化、柑橘病毒。

Key words: shoot-tip grafting, virus-freeing, citrus viruses.

前 言

為了獲得無病毒之柑橘繁殖用接穗，以降低經由病毒及似病毒所造成之經費損失，在1972年Murashige等人發展出頂梢嫁接(STG)技術，這是第一次嘗試在試管內完成。

* 國立臺灣大學植物病蟲害學系教授兼系主任

Dept. of Plant Pathology and Entomology, National Taiwan University.

利用熱療及珠心胚苗亦能獲得無病毒之柑橘植株，但前者對鱗砧病及鱗皮病病原消除效果不佳，後者則需要較長的時間來消除如植株有刺等幼年期不利特性。利用 STG 技術則可有效消除病毒而且沒有幼年期的問題。經由 Navarro等人 (1981) 進一步研究與技術改進，可獲得30～50%的嫁接成活率，移植到土中存活率達95%，而此大部分經顯微嫁接的植株都不再帶有病毒及似病毒且沒有幼年期特性，因此STG技術被廣泛應用於消除原種柑橘所帶之病毒及似病毒 (Virus and virus-like pathogens)。為了提高嫁接成活率，操作簡易化、及頂梢嫁接後之快速生長，經由多次STG實驗，完成目前所使用的改進方法，包括嫁接位置、切割方式、砧苗品種、進一步高成功率增殖和加速生長及繁殖。

材料與方法

STG改進法：自 Navarro等人(1975)所用之倒T型切割法改進為直角三角型挖穴法。砧苗方面，除目前所使用之枳橙外柳橙亦可。在無菌狀態下移出二週大之砧苗，距子葉上端1.5～2公分處切除頂端，距切口 2～3 公厘處自皮層挖出長寬約 0.3～0.4公厘之直角三角形的洞，再將商業品種(表1)頂端生長良好的幼芽生長點切下約 0.2公厘大小，移入先前挖好的洞裏，讓芽的切面和洞裏的維管束表面或皮層的切面接觸 (圖1)，

表 1. 用來做為 STG 來源之柑橘品種經檢定其感染病害的情形

Table 1. Citrus cultivars used as sources of shoot-tips and infections of citrus pathogens shown by indexing

品種	Variety	病害感染	imtective Pathogtns
椪柑	Ponkan	萎縮病、立枯病、破葉病	CTV, Likubin, CTLV
桶柑	Tan kan	萎縮病、立枯病、破葉病	CTV, Likubin, CTLV
柳橙	Leucheng	萎縮病、立枯病、破葉病	CTV, Likubin, CTLV
葡萄柚	Grapetruit	萎縮病、立枯病	CTV, Likubin
文旦	Buntan Pum.	立枯病	Likubin
白柚	Peiyu Pum.	立枯病	Likubin
Eureka 檸檬	Eureka lemon	立枯病、萎縮病	Likubin, CTV
茂谷柑	Murcott	萎縮病、破葉病	CTV, TLV

再蓋上和洞相同大小的皮層組織。用以STG的接穗品種經檢定往往帶有萎縮病毒、破葉病毒及立枯病病原(表1)。嫁接幼苗放於含液體培養液之試管中，經二天暗處理後，用紗布包蓋移入 23～35°C 溫室培養，二週後除紗蓋，培養2～3週。另依照 Navarro 等人之方法進行STG做為對照組。

雙嫁接法：過去一般方法在 STG 5～8週後，嫁接成功且在接穗處長2片葉子的 STG 苗才能自試管移出行缽植。改進方法在 STG 4～6 週後將砧木上之接芽切下直接嫁接到溫室生長良好之缽植砧苗上可促進接芽生長。將自 STG 苗莖頂1～1.5公分處，帶有已發芽之接穗或癒合良好但尚未發芽的一段切下，利用蠟膜，以旁接法嫁接到缽植

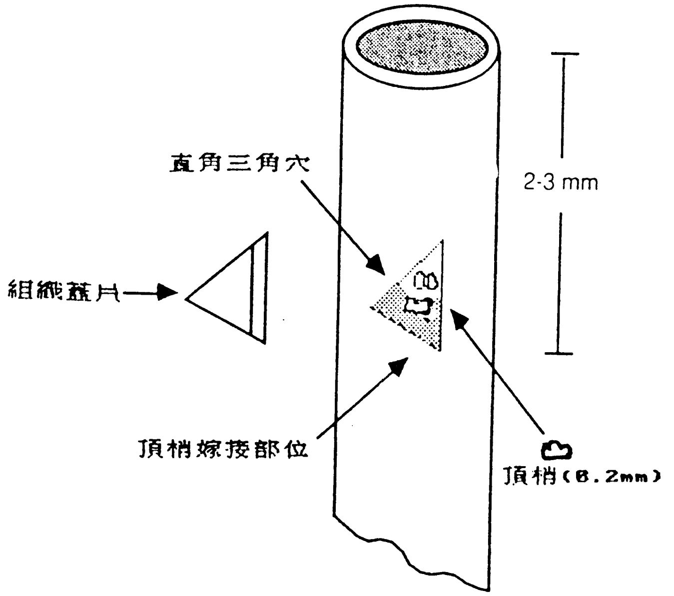

圖1　柑橘頂梢嫁接改進法

Fig. 1. Diagram showing modified technique of shoot-tip grafting by means of rectangular triangle-hole cut and tissue covering.

粗皮檸檬或柳橙實生苗之上方幼莖上，外圍以 PE 塑膠袋包被，置於溫室內培育。並於 STG 後不同時間間隔（4～6週）取出做旁接成功率之比較。

快速繁殖苗木：頂梢芽經STG及旁接到缽植苗，於溫室內生長約3～4個月可抽出幼枝條。

結果與討論

將自芽頂切下含三葉原體之芽點（生長點）置入倒T字型切口時極容易受到傷害，可能是造成嫁接成活率偏低之原因，一般低於20%（表2）。經實驗操作得知，要將芽點正確置入倒T字型切口並不容易，反之可輕易地將芽點置入直角三角形洞穴內，且切口可正確貼附維管束表層或皮層切口上而不受到傷害，另在洞穴外輕覆皮層組織，不會對芽點產生壓傷。此外，此薄層覆蓋組織部分常會和洞穴壁的組織再癒合，可維持芽點和砧苗癒合期間內足够的濕度，而芽點發芽時可突破覆蓋組織長出（圖2—A、B））。自砧苗切頂下2～3公厘處挖穴，保持穴與切頂間的一段，有助於 STG 芽的照顧（圖2—C、D）。和倒T字型法比較，本改進法可有效提高嫁接成活率，且高達60%以上（表2）。

以本改進法利用多種柑橘接穗品種以柳橙爲砧苗之嫁接成活率（75.8%）較目前常用之枳橙的成活率（60%）爲高，以倒T字型法利用枳橙爲砧苗之嫁接成活率則較低（18.5%）（表2）。大部分的接穗品種，包括椪柑、桶柑、柳橙及白柚，在柳橙砧苗上的STG 成活率極高，但文旦則無論以何者爲砧苗皆低於 50%。無論將芽點置於維管束

表 2. 倒T字型與直角型STG法之嫁接成功率比較

Table 2. Percentage of successful grafts affected by shoot-tip grafting methods, inverted-T cut in comparison with rectangular triangle-hole

嫁接品種 Variety	倒T字型法 枳橙* Inverted-T Citrange	正直角 枳橙* R. triangular Citrange	三角型法 柳橙* Triangular Leucheng
椪柑 Ponkan	2/23	3/5	4/5**
桶柑 Tankan	2/15	4/5	5/5
柳橙 Leucheng	3/10	3/5	5/5
葡萄柚 Grapetruit	5/11	4/6	5/8
文旦 Buntan Pum.	1/12	1/4	2/5
白柚 Peiyu Pum.	2/10	3/5	4/5
總數 Total	15/81(18.5%)	18/30(60%)	25/33(75.8%)

* 做為STG砧木之品種。 As rootstock of STG

**嫁接成功數目／嫁接總數。 No. of successful grafts/Total STG done.

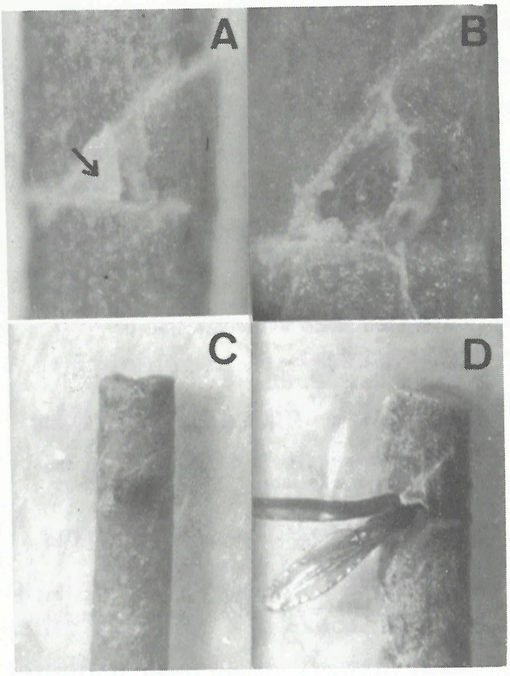

圖 2 在皮層的直角三角形穴內嫁接頂芽的生長情形

Fig. 2. Growth of shoot-tip (ST) in rectangular triangle-hole of cortex.

A. 椪柑頂芽嫁接在柳橙砧木上 4 週後。
4 wks. after ponkan STG on leucheng.

B. 桶柑頂芽嫁接在枳橙砧木上 4 週後。
4 wks. after tankan STG on citrange.

C. 葡萄柚頂芽嫁接在柳橙砧木上 2 週後。
2 wks. after grapefruit STG on leucheng.

D. 桶柑頂芽嫁接在柳橙砧木上 6 週後，桶柑芽自直角三角型洞內長出葉子。
6 wks. after tankan STG on leucheng, tankan was germinated from the triangular-hole.

表面或皮層切口上，其STG之成功率並無差別。

從整個試驗來看，一個適當的STG程序建議如下。經STG的苗於二天暗處理後，以紗布覆蓋移入溫室培養 2 週，再移除紗布蓋培養 2～3 週。依據過去方法，此時自接芽處至少會長出 2 片葉子，則可將此自STG後生長 5～8 週的砧苗自試管移出行缽植。經試驗發現，直接將含STG芽的一段嫁接到缽植實生苗的砧木上，可使接穗生長良好，與 De Lange (1978) 的報告相符。從表 3 中得知，STG 砧苗經 2 週成熟期，再加上 4 週健化期可獲得成功的再嫁接效果。其中再嫁接於粗皮檸檬時需要 5 週培養期而柳橙則需

6 週。下列所建議之再嫁接方式較爲理想。自 STG 砧苗頂端以下 1 ～1.5公分處切下帶 STG芽一段，將其旁接到生長良好之缽植粗皮檸檬或甜橙實生苗幼莖上，由於蠟膜具柔韌性，適於捆綁幼芽而不造成傷害，並可讓新生芽突破生長。假如旁接的 STG 芽已發

表 3. 自STG苗頂端切芽做雙嫁接之成功率

Table Successful grafts of doublemicrografting with apical stem-scions derived from STG.

缽植砧木品種	STG 後至雙嫁接之時間 (週)		
	4	5	6
粗皮檸檬	4/5	5/5	5/5
柳橙	3/5	4/5	5/5
總數	7/10	9/10	10/10

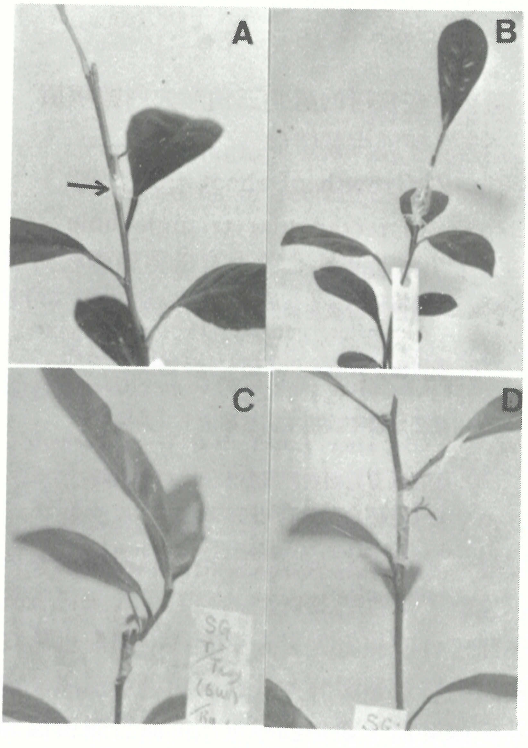

圖 3 STG苗穗再嫁接之過程

Fig. 3. Procedure of double grafting with STG grafted stem-scion.

A. STG苗莖穗（椪柑／枳橙，經STG 5 週後）用蠟膜固定旁接在粗皮檸檬砧木上（箭頭所指處）。
Tiny STG budling (Ponkan 5 wks after STG on citrange) were Sipe-grafted on R. L. rootstock with parafilm.

B. 以PE塑膠套住。
Bag with P. E. film.

C. 經旁接 6 週後，自嫁接處長出生長良好的椪柑枝條。
Souand ponkan twig developed from the graftage 6 wks later

D. 經旁接 8 週後，STG白柚芽（嫁接在枳橙砧上，再旁接到柳橙）自蠟膜包圍處抽出。
Peiyu Pummelo shoot grew up 8 wks after STG bulndig were side-grafted to leucheng stoek.

芽，則外層再包覆一層 PE塑膠袋（圖3B），沒有發芽者，則完全以蠟膜包圍，新生的芽將會突破蠟膜伸長出來（圖3D）。於 STG 後 3 ～ 4 個月，再嫁接的植株將可提供繁殖用芽。

大部分經STG處理所獲得的苗木，經檢定及 ELISA 測試，不再帶有萎縮病毒、破葉病毒、鱗砧病病原和立枯病病原。從嘗試自 STG 後快速增殖足够量的苗木之經驗中發現，自STG後 3 ～ 4 個月長出之尚未成熟的芽，其硬度已可以取下再進一步嫁接到粗

皮檸檬或甜橙幼莖上，做大量繁殖之工作。如果將接芽上方的莖葉朝另一方向反折，則可以加速接芽的發芽速率。於 STG 後一年內，每隔 3 ～3.5個月幼芽轉嫁接一次，共三次後，可獲得500個以上的供繁殖的芽體。

參考文獻

1. De Lange, J. H. 1978. Shoot-tip grafting—A modified procedure. *Citrus and Subtron. Fruit I* 539 : 13—15.
2. Hollings, M. 1965. Disease control through virus-free stock. *Ann. Rev. Phytopathol.* 3 : 367—396.
3. Murashige, T., W. P. Bitters, E. M. Naver, C. N. Roistacher, and P. B. Holliday. 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free *Citrus* Clones. *Hort Science* 7 : 118—119.
4. Navarro, L. 1981. Citrus shoot-tip grafting *in vitro* (STG) and its application: A Review. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 452—456. 1981.
5. ______C. N. Roistacher, and T. Murashige. 1975. Improvement of shoot-tip grafting *in vitro* for virus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 100 : 471—479.
6. Roistacher, C. N. 1977. Elimination of citrus pathones in propagative budwood. I. Budwood selection, indexing and thermotherapy. *Proc. Int. Soc. Citriculture* 3 : 965—972.
7. ______and S. L. Kitto. 1977. Elimination of additional citrus viruses by shoot-tip grafting *in vitro*. *Plant Dis. Reptr.* 61 : 594—596.
8. ______, L. Navarro, and T. Murshige . 1976. Recovery of citrus cultivars free of several viruses, exocortis viroid and *Spiroplasma citri* by shoot-tip grafting *in vitro* pp. 186—192. *In* E. C. Calavan (ed.), *Proc. 7th Conf. Int. Organ. Citrus Virol. IOCV*, Riverside.

Summary

The mother tree of the all citrus commercial varieties have been commonly affected by the systemic virus diseases caused by citrus tristeza virus, tatter leaf virus and exocortis viroid, and virus-like disease caused by likubin fastidious bacteria in Taiwan. Most of the bud-woods used for propagating citrus seedlings are generally infected with more than one virus pathogens mentioned above, and consequently the growth and fruiting of the citrus budlings are affected. The inverted-T method of shoot-tip grafting described by Murashige et al (1972) has been widely applied for freeing viruses of citrus foundation stocks, however the successful graft percentage is lower and time-consuming. More than 60% of successful graft was obtained by the present modified technique while the inverted-T method yielded less than 20%. A shoot-tip (about 0.2mm) was placed into rectangular triangle-

hole (0.3–0.4mm) cut at 2–3mm from the top of decapitated rootstock epicotyl instead of inverted–T cut. The hole was covered with a thin triangular epidermal tissue as large as the hole, derived from the same rootstock seedling. The micrografted seedlings were allowed to develop in *vitro* under cheesecloth–shaded condition for 2 weeks after 2–days incubation in the dark, and uncovered condition for another 2–3 weeks in greenhouse instead of growth–chamber condition. The apical stem–scions (1–1.5 cm long) from micrografted rootstock seedlings were directly side–grafted onto younger portions of potted seedlings of rough lemon or sweet orange which showed fast growth, and yielded propagative buds 3–4 months after STG. More than 500 propagative buds free of citrus viruses and likubin organism could be obtained from one shoot–tip of STG through 3 cycles of the young–bud grafting at 3–3.5–month interval within one year.

問　題　討　論

黃秋雄：

現園裏到底有幾個品種？破葉病 (tatter leaf virus) 事實在 New Comb他有一份報告是可以用血清 (serum) 的方法把它做出來，大概沒問題。我們唯一的問題是鱗砧病 (Exocortis) 我想這是比較大的問題。

蘇鴻基答：

他們用的品種不像臺灣這樣少，臺灣的破葉病大概是原生於中國 (origin) 因宮川 (Miyagawa) 他們是從臺灣引進去的，桶柑裏面他們馬上測到 (check) 一個地方，所以他們全國的許多品種沒有破葉病，現美國也一樣，破葉病是從北京檸檬 (meyer lemon) 無意中帶入的，他們沒分散去，但是臺灣的柑橘大概是中國系統的，在田間這樣久了。但不同的品種裏面用熱療不見得有效，臺灣的狀況下品種這樣多，我這次作的有的品種不容易去除 (elminate) 。還有在美國 Roistacher 也有同樣的結果，因破葉病可機械傳染，故在頂梢微體嫁接 (STG) 時所拿的嫩芽，它的頂梢在切時一定要從底下稍爲切進去，因你用的刀易碰到，若你用熱療嫁接了以後長出的芽不會帶毒，所以切時不會切到毒。但假如你用芽進去，他長出之芽頂端沒有病毒但底下還是帶有病毒。所以他們用熱療的結果也不可能把破葉病毒去除。

高淸文：

無病毒苗移至田間應如何避免再感染？

蘇鴻基答：

我們已出有一本小册子，裏面有寫了，我把它放在下一個題目內再詳細說明，怎樣去避免再感染是可以做得到的，雖然不是很完善，但是也可以做得到。